

## 公開特許公報

昭53-44685

⑥Int. Cl.<sup>2</sup>  
C 07 G 7/02識別記号  
1·1·2⑦日本分類  
36(2) C 05⑧内整理番号  
7048-49

⑨公開 昭和53年(1978)4月21日

発明の数 2  
審査請求 有

(全5頁)

## ⑩固定化酵素及びその製造方法

⑪発明者 上林明

千葉市稻毛東5丁目8番1号

⑫特 願 昭51-117780

工業技術院微生物工業技術研究所内

⑬出 願 昭51(1976)9月30日

同 木村均

⑭発明者 前田英勝

平塚市平塚792

千葉市稻毛東5丁目8番1号

工業技術院微生物工業技術研究所内

⑮出願人 工業技術院長

同

工業技術院微生物工業技術研究所長

鈴木英雄

⑯指定代理人 日本齊達株式会社

千葉市稻毛東5丁目8番1号

東京都千代田区大手町2丁目2

工業技術院微生物工業技術研究所内

番1号

## 明細書

## 1. 発明の名称

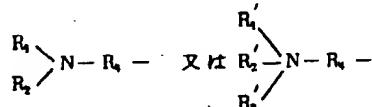
固定化酵素及びその製造方法

## 2. 特許請求の範囲

(1) 酵素と陰イオン交換基を有する木粉とが、該陰イオン交換基を介するイオン結合により結合することを特徴とする固定化酵素。

(2) 陰イオン交換基が

一般式



(式中 R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は水素原子又はアルキル基を、 R<sub>1</sub>'、 R<sub>2</sub>' 及び R<sub>3</sub>' はアルキル基を、 R<sub>4</sub> はアルキレン基又はアリーレン基を示す。)

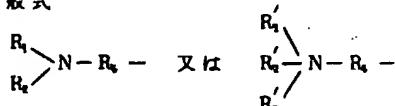
で表わされるアミノ基又は第四アンモニウムである特許請求の範囲第1項記載の固定化酵素。

(3) 木粉が粒径 0.1 ~ 5.0 mm である特許請求の範囲第1又は2項記載の固定化酵素。

(4) 陰イオン交換基を有する木粉に酵素を接触させて木粉と酵素とを結合させることを特徴とする固定化酵素の製造方法。

(5) 陰イオン交換基が

一般式



(式中 R<sub>1</sub> 及び R<sub>2</sub> は水素原子又はアルキル基を、 R<sub>1</sub>'、 R<sub>2</sub>' 及び R<sub>3</sub>' はアルキル基を、 R<sub>4</sub> はアルキレン基又はアリーレン基を示す。)

で表わされるアミノ基又は第四アンモニウムである特許請求の範囲第4項記載の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

本発明は陰イオン交換基を有する木粉を担体とする固定化酵素に関するものである。

近年、酵素利用工業において、触媒作用を持つ酵素を水溶性から水不溶性の性質に変え、こ

の水不溶性とした酵素を用いて酵素反応工程の過剰自動化を行う研究が進展し、実用段階に到達している。酵素を水不溶化、即ち固定化するためには各種の陰イオン交換体が使用されるが、この場合、イオン交換体に結合する酵素量がイオン交換体の表面積によって決まることから、多孔性の樹脂若しくはゲル状の樹脂の担体が要求される。しかしながら、この多孔性の樹脂若しくはゲル状の樹脂の製造においては非常に難しい技術が要求されるのみならず、価格の点でも非常に高価なものとなる。このような観点から多孔性で且つ表面積が大きく、しかも大量、普遍的に存在する担体を検討する必要が生じている。このような状況に鑑み、本発明者らが検討した結果、木粉、とりわけオガクズが記の要求を満たし、最適であることを見いだ。次いで、この担体へ各種の陰イオン交換基を導入し、所期の目的とする酵素固定化用の陰イオン交換体を調製することに成功した。

また、木粉、特にオガクズは本発明者らが以

前から効果的な目詰まり防止剤であることを見い出しており、そのため木粉を用いたイオン交換体の過剰抵抗はきわめて強烈であることも同時に発見した。また、オガクズ等は現在有効な利用方法がないことからその利用方法の開発が呼ばれており、廃棄物処理の観点からもオガクズのこのような利用方法は極めて有意義である。

本発明はこのような観点に基いてなされたものである。

従来、種々の担体へ陰イオン交換基を導入して陰イオン交換体とすることはよく知られている。特に、セルロースを担体とするイオン交換体は古くから知られている。しかしながら、セルロースイオン交換体は固定化酵素の担体として酵素反応塔に充填した場合、目詰まりを起し反応液が流れなくなる欠点を有しており、その改善が強く望まれていた。本発明の固定化酵素はこの欠点をも改善したものである。

本発明における木粉としては、製材所で排出されるオガクズを用いることができる。もちろ

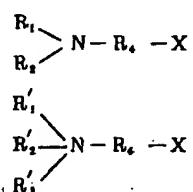
- 3 -

ん、木粉であればオガクズに限らず、他のものも用いることができる。この場合、木粉の大きさは、粒径 0.1 ~ 5.0 mm が最もよく、0.5 ~ 1.5 mm であり、また木材の種類に関しては特別の制限はない。

本発明で使用される陰イオン交換体を調製するには、まず、前記オガクズ等の木粉を水洗してその表面に付着する汚染物を除去したのち、アルカリ水溶液に浸漬接触させる。この場合のアルカリ水溶液としては、カ性ソーダ、カ性カリ等の 1.0 ~ 5.0% 水溶液が適用される。時間は通常 30 ~ 120 分程度である。アルカリ処理により、木粉を膨潤させるとともに、OH 基を -ONa 基に変換する効果が達成される。

次に、このようにしてアルカリ処理された木粉に対し、陰イオン交換基を有する陰イオン交換基導入試薬を作用させる。この場合の陰イオン交換基導入試薬としては通常使用される種々のものが使用可能であるが、一般的には次の

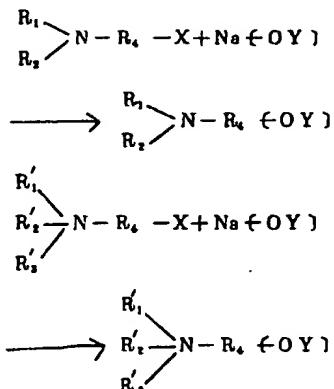
般式で示されるアミノ基又は第四アンモニウム基を有する有機ハライドが使用される。



(式中、  $R_1$  及び  $R_2$  は水素原子又はメチル、エチル、プロピル、ブチル、オクチル等のアルキル基を、  $R'_1$  、  $R'_2$  及び  $R'_3$  はいずれも同様のアルキル基を、  $R_4$  はエチレン、プロピレン、ブチレン、オクチレン等のアルキレン基又はフェニレン、キシリレン等のアリーレン基を、  $X$  は塩基、臭素等のハロゲン原子を示す。)

木粉と有機ハライドとの反応は、温度 50 ~ 100 °C、通常 80 ~ 85 °C で行われる。この場合、反応温度及び反応時間は木粉に導入する陰イオン交換基の数に応じて適当に調節する。この反応により、有機ハライドは木粉中に存在

するナトリウムアルコラート基と反応し、エーテル結合を形成して木粉中に導入される。この場合の反応は次の式で表わすことができる。



(式中、 $R_1, R_2, R'_1, R'_2, R'_3, R'_4$  及び  $X$  は前記と同じ意味を有し、 $N_3 \in OY$ ) は木粉を、  
 $\{OY\}$  は木粉残基を示す。)

反応終了後、生成物を水洗し、乾燥させて使用に供する。なお、使用に際してはカ性ソーダ水溶液で処理して活性化するのがよい。

このようにして得られる陰イオン交換体はす

- 7 -

本固定化法が適用できる酵素は陰イオン交換体に吸着可能な酵素すべてが該当する。即ち、グルコアミラーゼ、インペルターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、アシラーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ペニシリンアミダーゼ、アデニールデアミナーゼ、リバーゼ、 $\beta$ -チロシナーゼ、リポスクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、L-シーアミノカブロラクタムハイドラーーゼ等の酵素を本担体へ固定化することができる。また、酵素蛋白質は本担体重量の約10%まで結合させることができ、しかも一度吸着したものはかなりのイオン強度にならなければ溶出が起ららない。

本発明の固定化酵素をカラムに充填し、基質溶液を流した場合、その透過抵抗は極めて軽微

特昭昭53-44685(3)  
ぐれた陰イオン交換容量を有し、その性能は従来のセルロース系のものに匹敵する。

従来、オガクズ等の木粉に直接化学反応を行うことはセルロースの表面を覆っているグリグニンによって困難とされていたが、本発明によればこのような困難はなく、円滑に陰イオン交換基を導入反応させることができる。

本発明における陰イオン交換基としては、上述のアミノ基、第四アンモニウム以外の通常の陰イオン交換基が同様に適用でき、それらの陰イオン交換基の木粉への導入は通常の反応により行うことができる。

上記の如くして製造された陰イオン交換体に酵素を結合させるには、従来のセルロース系陰イオン交換体に酵素を結合させる通常の方法が適用できる。即ち、木粉からなる陰イオン交換体をアルカリ水溶液、例えば0.5Nカ性ソーダ水溶液で活性化後水でよく洗浄し、更に緩衝液で洗浄する。次いでこの担体を酵素液に加え吸着反応を行い酵素を固定化する。上記の固定化

- 8 -

である。例えば22%の液化デンプン溶液のような高粘度のものを、従来のジエチルアミノエチル(以下DEAEと略記)一セルロースの充填層へ通液すると目詰まりを起し通液不能となるが、DEAE-木粉の充填層の場合は全く目詰まりを起さず、通過抵抗も少く、良好に通液することが可能である。

今まで DEAE-誘導体とくに DEAE-セルロースは固定化酵素用の担体としてはきわめて優秀な性質を有し、吸着した酵素は溶出しにくい。従って、固定化酵素用の担体として推しうされるが、前述したような大きな滤過抵抗を持つため、实用化が困難視されていた。しかしながら、本発明によって DEAE-セルロースの利点を生かし、さらに DEAE-セルロースの欠点を大巾に改善することができた。

イオン吸着法による酵素の固定化法は、手法がきわめて簡単であること、強調活性が低下した場合、再生、再使用が可能であること等から工業的にはきわめて適した固定化法である。従

って、本発明を使用することによって固定化酵素の工業的製法の道が開け、酵素工業にあたえる影響はきわめて甚大である。

次に実施例によって本発明をさらに詳細に説明する。

## 実施例 1.

初めに D E A E - 木粉の製造法を述べる。

製材所から排出されたオカクズ 10kg を蒸溜水で水洗後、20% カ性ソーダ溶液に浸し、次いで戻過した。戻過後、ブナーロート上のケーリーをビーカーに移し、氷冷しながら、水 10ml に 10g のジエチルアミノエチルクロライド塩酸塩を溶かした液を加えた。よく搅拌後、油浴上で 80~90°C で 1 時間反応を行った。反応後、2M 塩化ナトリウム溶液 50ml を加えて戻過し、更に 1N カ性ソーダ溶液、蒸溜水で順次洗浄し、標品とした。陰イオン交換基導入数は 0.9 meq/g であった。塩化ナトリウム溶液中の  $pK$  値は pH 8.9 であった。

## 実施例 2.

実施例 1 で調製した D E A E - オカクズ 1g ヘグルコアミラーゼ 355 単位 (国際標準単位、pH 4.5, 40°C) (酵素蛋白量 9.9.4 mg) を吸着させた。その結果、350 単位が結合し、活性

-11-

全に固定化することができ、0.1M リン酸緩衝液で洗浄しても溶出することはなかった。また、350 単位の活性を結合した D E A E - オカクズ - グルコアミラーゼ複合体の活性は全体で 111 単位を有しており、活性収率は 32% であった。ついで、これをカラムへ充填し、50°C、流速 6.9 ml/hr で 2.4% 液化デンプンの糖化を行った結果、初めの分解率 78% が 1.2 日間持続し、活性の低下は認められず、きわめて効率的に液化デンプンを糖化することができた。

## 実施例 3.

実施例 1 で調整した D E A E - オカクズ 100 mg ヘインペルターゼ 4240 単位 (国際標準単位、pH 5.2, 40°C) (酵素蛋白量 4.5 mg) を吸着させた。その結果、3910 単位が結合し、ほぼ完全に固定化することができ、0.1M リン酸緩衝液で洗浄しても溶出することはなかった。また、3910 単位の活性を結合した D E A E - オカクズ - インペルターゼ複合体の

-12-

活性は全体で 1750 単位を有しており、活性収率は 45% であった。ついで、この複合体 50 mg をカラムへ充填し、40°C、流速 3.0 ml/hr で 2.5% 麻糸液を流し、麻糸の分解を行った結果、初めの分解率 55% が 1.2 日間持続し、活性の低下は認められず、きわめて効率的に麻糸を分解することができた。

## 実施例 4.

実施例 1 で調製した D E A E - オカクズ 1g ヘアシラーゼ 170 単位 (37°C, pH 6.5, 1 時間に 1  $\mu$ mol のクロロアセチル - D L - メチオニンを加水分解する酵素量を 1 単位とする) を吸着させた。その結果、160.2 単位が結合し、ほぼ完全に固定化することができ、0.1M リン酸緩衝液が洗浄しても溶出することはなかった。また、160.2 単位の活性を結合した D E A E - オカクズ - アシラーゼ複合体の活性は全体 286.5 単位を有しており、活性収率は 179% であつ

-13-

-434-

-14-

た。次いで、これをカラムへ充填し、42℃、  
1時間当たり 10 ml の流速で 0.05 モル濃度のク  
ロロアセチル-DL-メチオニンを連続光学分  
割した結果、分解率 100% が 20 日間持続し、  
活性の低下は全く認められず、きわめて効率的  
に DL-メチオニンを光学分割することができ  
た。

特開昭53-44685 (5)

出願人 工業技術院長

〃 日本曹達株式会社

指定代理人 工業技術院微生物工業技術研究所長

-15-

-435-